

Title	高度好熱菌 <i>Thermus thermophilus</i> HB 8 由来のポリペプチド鎖延長因子 (EF-Tu, EF-G) を含むオペロンの解析
Author(s)	久代, 明
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37050
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	く 久	しろ 代	あきら 明
学位の種類	薬	学	博 士
学位記番号	第	9 1 4 3	号
学位授与の日付	平成 2 年 3 月 24 日		
学位授与の要件	薬学研究科薬品化学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当		
学位論文題目	高度好熱菌 <i>Thermus thermophilus</i> HB 8 由来のポリペプチド鎖延長因子(EF-Tu, EF-G)を含むオペロンの解析		
論文審査委員	(主査) 教授 富田 研一	(副査) 教授 今西 武	教授 岩田 宙造 教授 北川 勲

論文内容の要旨

70°C以上でも生育可能な高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 よりポリペプチド鎖延長因子 EF-Tu をコードする遺伝子を 2 個 (tufA 遺伝子, tufB 遺伝子) クローニングした。tufA 遺伝子の 5' 末端上流には EF-G をコードする fus 遺伝子があり, tufB 遺伝子の 5' 末端上流には tRNA をコードする遺伝子群が並んでいた。T. *thermophilus* HB8 の EF-Tu は 405 アミノ酸残基より成り、分子量は 45 KDa であった。大腸菌と T. *thermophilus* HB8 の EF-Tu の アミノ酸配列の相同性は 70.4% であった。好熱菌の tuf 遺伝子の G+C 含量は 62.9%, コドン 3 文字目の G+C 含量は 84.5% と高く, 好熱菌の染色体 DNA は強く G+C pressure を受けている事がわかる。tufA 遺伝子と tufB 遺伝子を比較した所, 11 箇所 で塩基置換が起こっており, そのうち 5 箇所 でアミノ酸置換 (保存性のあるアミノ酸置換は 3 箇所) が起こっていた。終止コドンも UGA (tufA 遺伝子) ↔ UAA (tufB 遺伝子) に変化していた。G+C pressure の強くかかったバクテリアにおいて UAA が終止コドンとして機能している例が見つかった。大腸菌の EF-Tu のアミノ酸配列に対応しない配列が T. *thermophilus* HB8 の EF-Tu 中に見出された。それは Met-182 ~ Gly-191 の配列で, この周辺領域は非常に親水性に富み, 且つ 10 アミノ酸残基中 5 個が塩基性アミノ酸であるなど特徴的な配列であった。又, この配列は大腸菌の EF-Tu においては α ヘリックスと α ヘリックスを結ぶループにあたる事を考慮に入れると, この部分が溶媒側に露出して負に荷電した基質 (例えばリン酸基など) と相互作用をしているものと思われる。次に T. *thermophilus* HB8 の tufA 遺伝子の大腸菌内における発現を試みた。発現ベクターとしてトリプトファンプロモーター (trp promoter) を有し, trp promoter の下流に多くの制限酵素切断部位を有するプラスミド pKH9 を作成した。これに T. *thermophilus*

HB8 の *tufA* 遺伝子を組み込み、大腸菌に形質転換し、発現を行なった。発現量としては大腸菌の総蛋白質量の7~8%であった。次にこの発現された *T. thermophilus* HB8 の EF-Tu が大腸菌内で機能しうかを調べた。方法としては大腸菌の *tuf* 遺伝子に変異が起こり、抗生物質キロマイシンに対し耐性を示す変異体 LBE2012 を用いた。この変異体に正常な *tuf* 遺伝子が導入され、正常な EF-Tu が発現され、機能するとキロマイシンに対し感受性を示すようになる。そこで *T. thermophilus* HB8 の *tufA* 遺伝子を発現ベクターに組込んだプラスミドをこの変異体に導入した所、表現型がキロマイシン耐性からキロマイシン感受性に変化した。この事より *T. thermophilus* HB8 の *tufA* 遺伝子が大腸菌内で発現され、機能している事が判明した。次に *tufA* 遺伝子が含まれているストレプトマイシンオペロン (*str* オペロン) のクローニングを行なった。このオペロンはリボゾーム蛋白質 S12 遺伝子 (*rpsL* 遺伝子), S7 蛋白質遺伝子 (*rpsG* 遺伝子), EF-G 遺伝子 (*fus* 遺伝子), EF-Tu 遺伝子 (*tufA* 遺伝子) より構成されていた。このオペロンのプロモーター配列としては *rpsL* 遺伝子の 5' 末端上流に大腸菌のプロモーター配列と相同性の高い TTGCCA (-35 領域), TACACT (-10 領域) 配列が見つかった。SD 配列は各遺伝子の開始コドンより 5~6 塩基上流にみいだされたが、*rpsG* 遺伝子の SD 配列と *rpsL* 遺伝子の 3' 末端の構造遺伝子とが、また *fus* 遺伝子の SD 配列と *rpsG* 遺伝子の 3' 末端の構造遺伝子とが重なり合ったコンパクトな遺伝子構成を取っていた。アミノ酸配列を比較した所、大腸菌で用いられていた Cys 残基は *T. thermophilus* HB8 では Val, Ala 残基に置換されているのが目についた。コドン使用頻度は 3 文字目が G または C であるコドンが多く用いられていた。しかし、*fus* 遺伝子と *tuf* 遺伝子の Phe の Ile のコドンとしては 3 文字目が U である UUU, AUU が用いられる場合が目立った。その理由としては *T. thermophilus* HB8 は制限酵素 TthHBI を産生し、その認識配列は TCGA である。もし、Phe と Ile のコドンとして $N_1 UC (N_1 = A \text{ or } U)$ が用いられると、(Phe or Ile)-(Asp or Glu) をコードする際、 $N_1 TCGAN_2 (N_2 = A, G, C, \text{ and } T)$ となり、TCGA 配列が現われてしまう。この様な場合 UUU/AUU コドンが選択的に使用されると推定できる。*fus* 遺伝子では UUU/AUU コドンが 12 回、*tufA* 遺伝子では 23 回使われたが、そのうち上記の理由で説明できたのは *fus* 遺伝子では 11 回あったが、*tufA* 遺伝子では 4 回に過ぎず、残りの 19 回についてはいまだ説明がつけられない。次に *T. thermophilus* HB8 の *str* オペロンの遺伝子発現の制御機構についての考察を加えた。*T. thermophilus* HB8 と大腸菌の 16S rRNA の 2 次構造は良く似ており S7 蛋白質は U-1222 に結合すると思われる。大腸菌では *rpsL* 遺伝子と *rpsG* 遺伝子の間の領域 (intercistronic region) が 16S rRNA の 2 次構造と似た構造を取り、S7 蛋白質が 16SrRNA だけでなく mRNA にも結合し、*rpsG* 遺伝子の発現を制御していると考えられている。*T. thermophilus* HB8 の場合では、*rpsL* 遺伝子の 5' 末端領域の mRNA が 16S rRNA の 2 次構造に似た構造を取りうる事がコンピュータ検策より明らかになった。この事より S7 蛋白質は *rpsL* 遺伝子の mRNA に結合し、*rpsL* 遺伝子のみ、あるいは *rpsL* 遺伝子及び *rpsG* 遺伝子両方の翻訳段階でのリプレッサーとして働いている可能性があると考えた。最後に *rpsG* 遺伝子の 5' 末端周辺領域では purine-base rich な塩基配列が 130 塩基中に 4 回繰り返されていた。さらに、この繰り返し配列中には non-optimal codon が多く含まれていた。この意味としては翻訳速度を減少し、*rpsG* 遺伝子または、その下流の遺伝

子の翻訳を制御している可能性や繰り返し配列が形成するループ構造に何らかの意味があるように思われる。

論文の審査結果の要旨

久代君は、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来のポリペプチド鎖延長因子のクローニング、大腸菌内での発現およびストレプトマイシンオペロン遺伝子の解析などを行ない、遺伝子発現の制御機構、使用コドンの特異性など多くの新しい知見を得た。

以上の研究は、分子生物学や蛋白質生合成分野に多大の貢献をしたものと認め、薬学博士の学位請求に十分値するものである。